

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 02177950
PUBLICATION DATE : 11-07-90

APPLICATION DATE : 28-12-88
APPLICATION NUMBER : 63331933

APPLICANT : NIKKEN FOOD HONSHA KK;

INVENTOR : KUBOYAMA MORIO;

INT.CL. : A61B 10/00 A61B 5/20 G01N 33/50

TITLE : METHOD FOR MEASURING DEGREE OF AGING OF HUMAN BODY

ABSTRACT : PURPOSE: To predict the degree of progression of aging and to make prevention so as to deal effectively with the diseases of aged persons by measuring the nucleic acid decomposition products discharged into the urine.

CONSTITUTION: The modified nucleic acid base: 8-hydroxydeoxyguanosine discharged into the urine is measured by high-performance liquid chromatograph and an electrical UV part detector. The degree of aging is measured according to individuals and the capacity of the bodies with the measured value as the index for the oxidative stress of the whole body. Taking of the urine is executed by taking the whole volume for 24 hours from 0.00PM to 0.00PM of the next day into the same container. The small quantity thereof is filtered. The urine passes previously through a column cleaned with methanol and distilled water and is eluted by the distilled water and 35% methanol. The filtrate is subjected to fractionation with water and the fractionation with the 35% methanol. The solvent is 50mM phosphoric acid buffer soln. (pH5.5) and the same buffer soln. of 10% methanol or 12.5mM citric acid buffer soln. (pH5.1) and the same buffer soln. of 10% methanol, which are subjected to 60 to 60 min gradient. The measurement is made with a UV part diode array and EC detector.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-177950

⑮ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)7月11日

A 61 B 10/00

D 7831-4C

5/20

7831-4C

G 01 N 33/50

P 7055-2G

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全7頁)

⑭ 発明の名称 人体の老化度を測定する方法

⑯ 特 願 昭63-331933

⑰ 出 願 昭63(1988)12月28日

⑱ 発 明 者 越 智 宏 倫 静岡県袋井市春岡693-20

⑲ 発 明 者 久 保 山 盛 雄 東京都世田谷区代沢1-19-11

⑳ 出 願 人 日研フード本社株式会社 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目1番8-305
社

㉑ 代 理 人 弁理士 鈴木 正次

明 細 書

1. 発明の名称

人体の老化度を測定する方法

2. 特許請求の範囲

- 1 全身的な酸化的ストレスを指標として測定することを特徴とする老化度測定法
- 2 指標は、尿中(24時間採取)の修飾核酸塩基であることを特徴とする老化度測定法
- 3 修飾核酸塩基は、8-ハイドロキシデオキシグアノシン等とすることを特徴とする老化度測定法
- 4 尿中に排泄される酸化的ストレス由来の修飾核酸塩基を測定し、老化進行の予防・防止方法をモニターするために用いる老化度測定法
- 5 測定手段として、高速液体クロマトグラフにより電気化学的および紫外吸収検出器により、修飾塩基、尿酸、クレアチニンの同時測定を可能とする条件を用いることを特徴とする老化度測定法
- 6 尿中に排泄される酸化的ストレス由来の修飾核酸塩基を測定できる機能を備え、糖尿病・循環器

系疾患・アルツハイマー病・虚血性疾患・自己免疫疾患等、老人病の予知が出来るようにした老化度測定器

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、尿中に排泄される核酸分解物(8-ハイドロキシデオキシグアノシン)を簡易的に分析定量する測定方法に関するものであり、特に、老化の進行度を予測するため、また、老化を遅らせる物質を探索するために利用し、さらに糖尿病・循環器系疾患・アルツハイマー病・虚血性疾患・自己免疫疾患等の老人病の予測予防方法を探索するために利用する老化度測定器に関するものである。

(従来の技術)

長年にわたり、これまで老化の程度を知るために、いろいろな方法が考案されている。老化は、老徴と言われる多くの外観的、機能的な特徴によて表現されており、10年単位で各年齢を分類すれば、老徴は大別的に当てはまる。しかし、同じ

年代の高齢者間で見ると、それぞれ寿命の差が大きいように、老徴も違っており、一概に老化の程度はわからない。

大別的な老徴の分類は、例えば、表1のように報告されている（亀山正邦 内科51,1022 1983）。

表1 生理的機能の加齢による変化

<p>A. 身体構成成分</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 脂肪以外の身体構成成分の減少 2. 脂肪の増加 3. 血漿量の減少 4. 血漿アルブミンの減少 <p>B. 心血管系</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 心：心拍出量低下、肥大、ストレスに対する反応の低下 2. 循環：血管弾性の低下、血管壁肥厚、末梢血管抵抗の増加、腎、肝、脳、筋肉の血流減少 <p>C. 腎</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 機能的ネフロン数の減少 2. 糸球体濾過率および腎血流の減少 3. 血清クレアチニン不変、クレアチニンクリアランス低下 4. 尿管機能の低下 <p>D. 消化管系</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 唾液、胃液などの分泌の減少 2. 吸収の軽度低下 	<ol style="list-style-type: none"> 3. 能動輸送の減少 4. 食道蠕動の低下 5. 胃排空率の低下 <p>E. 肝</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 重量減少、ただし機能の変化は軽度 2. 薬物代謝の低下（？） <p>F. 神経系</p> <p>脳：血流量の減少、短期記憶の低下、協同運動の低下、脳機能低下薬に対する閾値の低下</p> <p>G. 肺</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 胸郭の変化 2. コラーゲンのcross-linking を伴った弾性の低下と強直の増加 3. 機能的残気量・死腔の増加 4. 強制呼吸量の減少 5. 気管・気管支絨毛の数の減少、運動の低下 <p>H. 内分泌腺</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ホルモン分泌量の減少 2. 耐糖能の低下 3. 副腎のcatabolic activityのバランスの変化
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

日野原は、身体の機能を表2のように16の項目に分類し、各項目にスコアを与え、合計点から老化度を算出し、第6図の如き結果を得ている(日野原重明 日老医誌16.238 1979)。

表2 機能上の老化度の測定

1. 白内障	9. 尿比重と夜間排尿回数
2. 聴力	10. PSP異常
3. 心臓刺激伝達異常	11. B S P異常
4. 冠不全	12. たんぱく
5. 血圧の動揺性	13. 血色素量
6. 眼底細動脈硬化度	14. 老人性骨変化
7. 大動脈の硬化度	15. 胃液酸度
8. 擬負荷試験値	16. 前立腺肥大

一方、老化を起こす因子として、近年、フリーラジカルの存在とそのかわり合いが論じられて来ている。

生体内に、発生する活性酸素は、正常な細胞、組織に損傷を与え(酸化的ストレス)、老化を起

ロキシデオキシグアノシン、チミグリコールそしてチミジグリコールは、核酸に放射線を照射した時に生成されることも知られている(葛西ら; 癌, 75:1037.194. フレンケルら; Biochemistry, 20:7568.1981)。血液中の過酸化脂質と老化とのかかわり合いはよく知られているが(ストレーラーら; J.Gerontol., 14.430.1959)、この過酸化脂質と酸化的ストレスとの間に相関性もあることが我々の研究により強く示唆されている。

(発明が解決しようとする課題)

老化度測定法は、老化の基準を客観的に設定することで一致しているが、臓器機能の加齢変化は、個体差が著しいので、ある臓器の機能から個体差を推定するのは不可能である。又、スコア方式についても多次元ベクトルとしての老化の尺度に一步接近しているとは言えるものの、情報の重みが科学的に決定されていない欠点がある。以上のごとく、これまでも老化度の測定をいろいろ試みられてはいたが、満足すべきものが得られていない。

こす原因の一つに考えられている(カトラー: 第2回協和発酵バイオサイエンスシンポジウム、東京 1985.9、ソハール: Basic Life Sci. 35:75.1985)。

また、糖尿病、虚血性疾患、腎炎、動脈硬化症自己免疫疾患、癌等、成人病と称される疾患は、その原因機序に活性酸素が関与することが強く示唆されている(コーエンら; J.Biol.Chem., 249:2447.1974, マエストロ; Acta.Physiol.Scand. 492(suppl.):153.1980, トーマスら; Adv.In Free radical & Biol Med., 2.347.1986. ステファンら; J.Neurological Sci., 87:319.1985. 末松ら; 医学の歩み, 142:729.1987. 阿部ら; 医学の歩み, 142:742.1987)。活性酸素は、細胞の核酸を修飾し、或いは細胞死に至らしめることが推測され、核酸由来とみられる修飾塩基; チミグリコール、チミジグリコールが尿中に検出され、動物種の酸素消費量と相関が認められ、老化とのかかわり合いを示唆している(エーデルマンら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 85.2708.1988)。また、8-ハイド

老化防止策は、食物摂取の栄養的な観点、筋肉・骨組織機能維持の運動生理学的な観点、住宅環境の改善、太陽光線被曝防止などの物理学的な観点等、いろいろ方法がある。しかし、その最適化をモニターする実用的な方法はない。

上記のように、個人々々について、体の遺伝的背景、ライフスタイル、栄養の摂取状況が違っており、このような状況下で老化を防止する為の実用的なモニターの方法は未だ提案されていない。(課題を解決する為の手段)

本発明は、尿中の核酸分解物; 8-ハイドロキシデオキシグアノシンについて、老化とのかかわり合いを種々検討した結果、老化促進度の指標となることを見だし、上述した老化度の測定法の問題点を解決し、本発明を完成した。

すなわち、尿中に排泄される修飾された核酸塩基; 8-ハイドロキシデオキシグアノシンを高濃度クロにより電気的・紫外線検出器を用いて測定し、これを全身的な酸化的ストレスの指標とし、個人、体の能力に応じて、老化度を測定する方法

を提供するものである。活性酸素による酸化ストレスは、従来の技術の所で記載したように、成人病はじめ数多くの疾患の原因機序であり、著者らは、老化すなわち細胞核酸の損傷をおこす活性酸素とその防禦について次の概念を推測するに至っている。

酸化ストレスは以下のように定義される。

酸化ストレス (Oxidative stress OS)

$$= K \left(\frac{\Sigma [\text{活性酸素}]}{\Sigma [\text{抗酸化性物質}]} \right)$$

乃至は $OS = K' (\Sigma [\text{活性酸素}] - \Sigma [\text{抗酸化性物質}])$ 。K 及び K' は常数である。

以下、この経緯を詳細に述べる。

○ 8-ハイドロキシデオキシグアノシン (8OHdG) の調製

標準物質として用いた 8OHdG は、池原らの方法 (Chem. Pharm. Bull. 13, 1140-1142, 1965) に従い合成した。

すなわち、1 g のデオキシグアノシンを原料とし、780 ml の 0.13 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解

後、140 ml の 0.1 M アスコルビン酸、0.1 M FeSO₄ と 65 ml の 0.1 M EDTA をそれぞれ加え 37℃ で酸素を吹き込みながら 3 時間反応を行った。終了後、遮光で 1 N 塩酸で pH 3.7 とし、10 g の活性炭を加え、十分攪拌後、それをガラスカラムに通し濾過した。カラムの残留物は、蒸留水で数回洗浄後、500 ml の水・アセトン (1:1, v/v) で溶出させた。溶出液は、エバポレーターを用いて濃縮乾固し、さらに高速液体クロマトグラフィーを用いて、精製を行った (column: supelco 社、ODS 4.6 × 100 mm, solvent: 15% MeOH)。その結果、8OHdG は、約 90 mg の白色結晶として得た。

本物質の NMR スペクトル、UV スペクトル、HPLC クロマトグラムを第 1 図、第 2 図、第 3 図に示す。

○ 尿中の 8-OHdG の定量法

次に、人の尿に微量存在する 8OHdG の分析方法について記載する。

尿検体の調整：尿の採取は、午後 0 時から翌日

の午後 0 時までの 24 時間の全量を同一容器に採取し、その少量を、フィルター (0.22 μm) で濾過した。尿は、予めメタノールと蒸留水で洗浄したカラム (C18: sep-pack, ミリポア社) に通し、蒸留水と 35% メタノールで溶出させ、それぞれの濾液を、水分画、35% メタノール分画とした。HPLC の設定：ヒューレット・パカード社の HPLC 1090 で、カラムは、supelco 社の ODS 系のプレカラムと C18S 250 × 4.6 mm を用いた。溶溶剤は、50 mM 磷酸緩衝液 (pH 5.5) と 10% メタノール同緩衝液あるいは、12.5 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.1) と 10% メタノール同緩衝液で、0-60 分間のグラディエントをかけ、紫外部ダイオードアレイ (205, 231, 293 nm) と EC 検出器 (東ソ社; EC-8000) で測定した。標準物質として、8OHdG の他に、尿酸そしてクレアチニンを用いた。

本発明は、測定手段として、高速液体クロマトグラフにより ODS 系カラム LC18S 等、20 cm × 4.6 mm (1-2 本) を用い、リン

酸等の酸性側緩衝液 (pH 4.5 ~ 6.0) に 10% メタノール等のグラディエントを (0-60 分間) かけ、電気化学的 (印加電圧 550 mV ~ 700 mV) および紫外部吸収検出器 (231, 243, 293 nm) により、修飾塩基、尿酸、クレアチニンの同時測定を可能とする条件を用いることを特徴とする老化度測定法である。

また本発明の測定器の構成は、上記のごとく詳しく述べたが、A. 尿の処理工程、B. 高速液クロのカラムによる分離、C. 検出器として電気化学的もしくは紫外部吸収によるシステムである。糖尿病・循環器系疾患・アルツハイマー病・虚血性疾患・自己免疫疾患等、加齢に伴う諸疾患の予知が出来るようにした老化度測定器である。

(実施例 1)

ここで健康人男子 25 名 (20-35 才: 7 名、36-50 才代: 18 名) について、尿中の 8OHdG を測定し、8OHdG と年齢との相関関係を調べ、統計学的に検討を行った。その結果、35 歳以降においては、加齢に伴う 24 時間尿中の 8OHd

G/kg体重の消長変化に有意の正相関が見られた ($\alpha = 0.65$, $n = 18$, $p < 0.01$, $y = 0.052x - 1$) (第4図)。すなわち、若々しさが失われてきて、老徴が顕著に出現しだす約35歳以降は、8-OHdGは加齢とともに増加が見られることがわかった。成長過程(20歳から30歳前後)においては、代謝が活発に行われ、細胞の交代が烈しいため8-OHdGの排泄はむしろ、増加し、8-OHdGは高く維持されている(みかけの老化)。30歳ごろに生物学的に成熟が終わり、35歳ごろまで8-OHdGの変動はみられるが、相関はない。35歳以降では、8-OHdGのレベルは必ずしも高くはないが、上昇を続け、50歳以降では、顕著になる。これは、明らかに加齢に伴う変化とすることが出来る。

(実施例2)

上記、健康人について、血清中の過酸化脂質を八木法(過酸化脂質実験法、金田ら、1984年、医歯薬出版)により測定し各々の8-OHdG値と対比を行った。その結果を第5図に示す。血清中の

過酸化脂質の上昇と尿中の8-OHdGは、相関を有することがわかった。

老化の指標として、過酸化脂質値が使われることがあるが、採血を経なければならず、その点尿中の修飾塩基の測定法は非侵襲的であるのできめて便利に利用できる。

(実施例3)

早老症として知られる疾患；ダウン症患者の尿中の8-OHdGを経時的に測定したところ表3のように年齢を問わず健康人に対し排泄量が多く、老化が促進されているのが明らかに認められた。

表3

症 例	性 別	年 齢	8-OHdG $\mu\text{g/kg}$			備 考
			3 月	6 月	12 月	
ダウン	♀	14	8	8	7	容貌の変化が 烈しい
ダウン	♂	19	8	6	8	容貌の変化が 烈しい
対 照	♂	17	2	3	2	

(実施例4)

放射線による照射治療を受けた患者の尿中の8-OHdGを治療前後に亘って測定した。照射にしたがって、8-OHdGの増加傾向が見られた(表4)。

表4

症 例	性 別	年 齢	照 射 量	8-OHdG $\mu\text{g/kg}$				
				照射前	照射後1週間	2週間	1ヶ月	2ヶ月
食道がん	♂	85	300rad×30 隔日	4	9	8	8	
卵巣がん	♀	59	300 rad×10 隔日	3	12	8	4	

(発明の効果)

本発明によれば、尿中に排泄される核酸分解物を簡易に測定するものであるから、老化の進行度を予測することとができると共に、老化を遅らせ

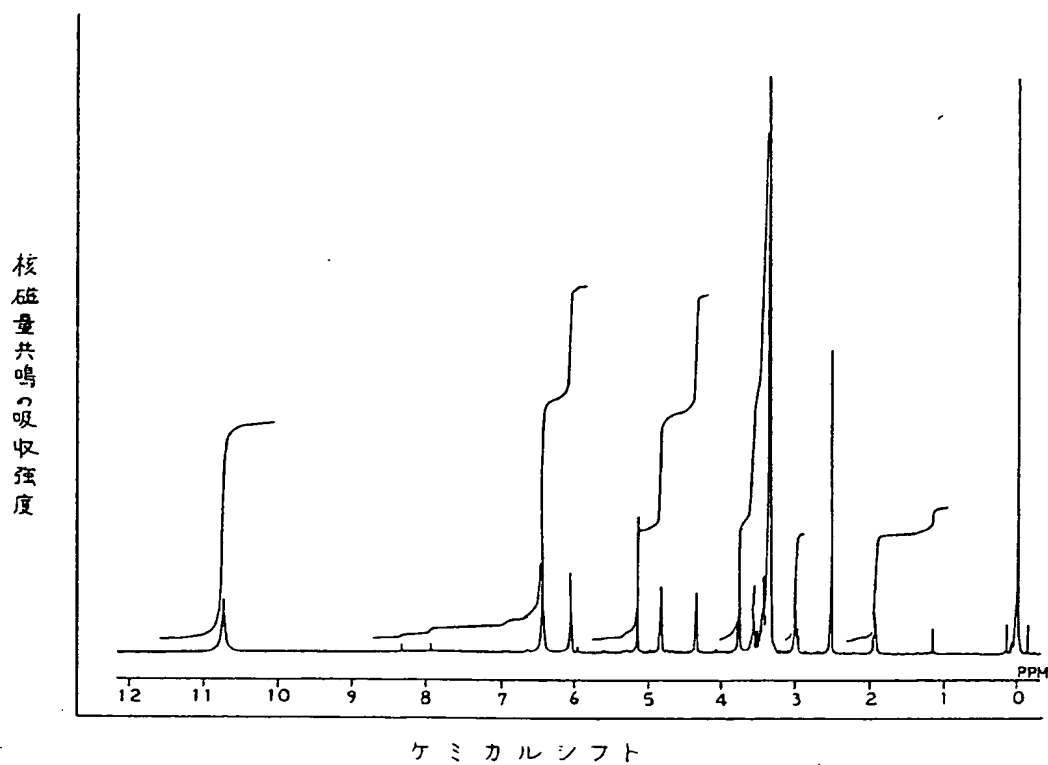
る物質を探索する為に使用し、糖尿病、循環器系疾患、アルツハイマー病、その他の老人病に有効に対処し、これを予防し得る効果がある。

4. 図面の簡単な説明

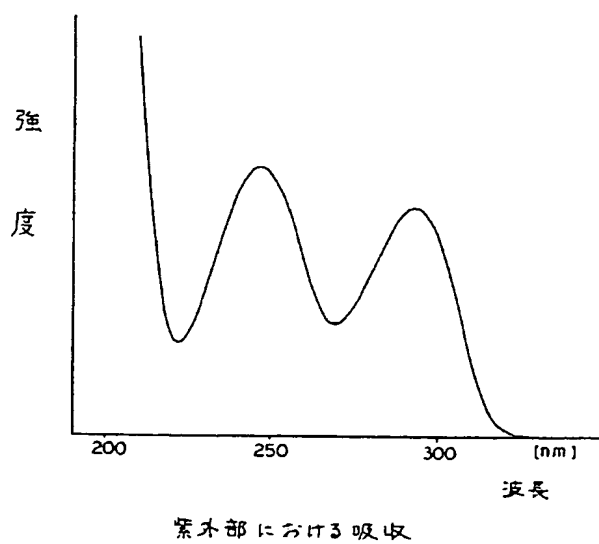
第1図は8-OHdG標品のNMRスペクトル、第2図は8-OHdG標品のUVスペクトル、第3図は8-OHdG標品のHPLCスペクトル、第4図は健康人24時間当りの尿中の8-OHdG値、測定による年齢とのクラスター分析、第5図は健康人24時間当りの8-OHdG値と血液中の過酸化脂質値との相関関係を示す図、第6図は機能上の老化度測定の判定点と年齢とのグラフである。

特許出願人 日研フード本社株式会社
代 理 人 鈴木 正 次

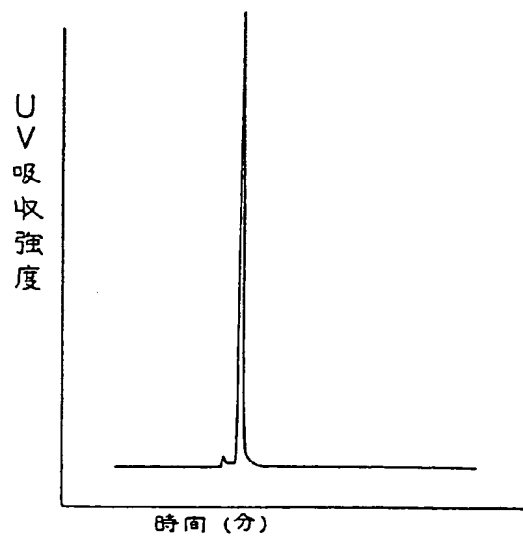
第 1 図



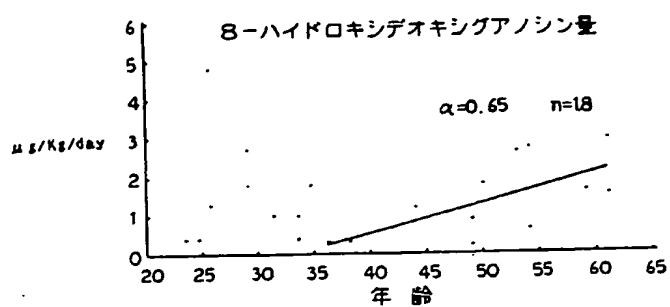
第 2 図



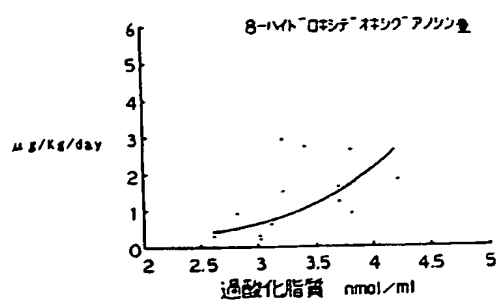
第 3 図



第4図



第5図



第6図

